

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19098

研究課題名(和文)健康長寿を目指す高齢者心疾患における治療および予防のための糖鎖関連老化因子の解明

研究課題名(英文) Study of aging-related glycan factors for the treatment and prevention of elderly heart disease

研究代表者

板倉 陽子 (Itakura, Yoko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30582746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内機能に深く関わる糖鎖に着目し、高齢者心疾患を念頭に心臓における糖鎖および様々な細胞発現分子と心臓組織の加齢に伴う質的变化を調べることを目的とした。そこで、週齢の異なる正常マウスの心臓を用いて糖鎖の網羅的な解析を行い、取得した糖鎖情報をもとに組織染色を行った。その結果、領域に応じた継時的な糖鎖変化、および組織変化が生じること、線維化が徐々に増加すること、そしてその変化の時期が雌雄でわずかに異なることを明らかとした。このような変化は領域特異的に、また性差が生じる疾患と関連性が存在すると予想される。今後は、より詳細な加齢研究により、高齢者における疾患予防への発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常マウスの心臓において、雌雄どちらも加齢に伴い糖鎖に示される分子変化に加え、組織変化が領域ごとに生じること、そしてその変化の時期にはわずかに違いが存在することが示唆された。このような変化は領域特異的に生じる疾患と何らかの関係性が存在すると予想される。本研究成果は、高齢化に伴う心疾患患者の予防ならびに治療へと貢献することで、健康で機能的な生活を確保するために重要な役割を果たすと考えられる。今後は、より詳細な分子変化と各心疾患との関連性を明確にして、高齢者における疾患予防への発展を目指す。

研究成果の概要(英文)：Elderly cardiac disease makes increase various risks, so the appropriate treatment is essential under mild condition. Identifying molecular changes in cardiac tissue can bring about a development the early diagnosis and appropriate therapy for age-related heart failure. This study was investigated the glycan localization of cardiac tissue in normal mice and the alteration with aging. The cardiac tissue with different age was analyzed using evanescent-filed lectin microarray and stained with some lectins. In consequent, it was found that some glycans changed in papillary muscle and left ventricular wall with aging. The fibrosis in normal mice hearts increased gradually. The timing of their molecular changes was different between female and male mice. It is essential that substantive implications of glycans are revealed by analysis for glycan changes during aging. To show the age-related change in mouse would be helpful for identifying a turning point of disease and aging for human.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：老化 心臓 組織 糖鎖 心血管

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人の死因別死亡原因第2位は心疾患である（平成25年厚労省調べ）。虚血性心疾患患者の場合、年齢とともに増加し（厚労省推移）、男性は60代、女性は70代に発症ピークを迎えることが報告されている。梗塞後の心筋は壊死してほぼ再生することはない。このような心疾患における治療法としては心臓移植（人工臓器を含む）などが主であるが、ドナー数の確保、人工器具の耐久性、外科的手術に対する体力面のリスクなどが存在し、高齢患者への負担の少ない治療法の検討が急務である。

(2) 細胞表層に存在する糖鎖はがん化や分化に伴い変化することが明らかになっており、細胞間接着や情報伝達において生体内変化に非常に重要だと考えられる。これまでに申請者が様々な細胞の糖鎖を網羅的に解析してきた結果、マウスやヒトにおいて幹細胞やがん細胞、その分化誘導体などに固有の糖鎖が存在することを明らかとしている。また、ヒト老化モデル細胞において老化に関わる糖鎖変化を示唆する結果を取得している（文献1、2）。一方、海外では、心疾患と糖鎖の関連性を示唆するレクチンの報告がなされているが、その直接の関係は明らかとなっていない（文献3、4）。

(3) 「循環器領域における性差医療に関するガイドライン」において記載されているように、心疾患ではその疾患の種類と性差により発生率が異なることが報告されている。

2. 研究の目的

高齢者心疾患において、心臓は再生能力の低さなど治療による根治は難しい上に、人工心臓ならびに人工弁による治療法にもまだまだ課題が多く残されている。根本的な解決のために、まずは心臓における各組織の機能低下における状態の把握と原因の解明が必須である。本研究では、細胞接着や情報伝達など様々な生体内機能に深く関わる糖鎖に着目し、老化に伴う心臓の質的变化および性差における心臓と老化との関連性を明らかにすることを目的とした。また、将来的に高齢者疾患の治療および予防のために、糖鎖機能を明らかにし医療への貢献を目指した。

3. 研究の方法

老年病解明のため高齢者心疾患を念頭に、世代の異なるマウスにおける心臓の質的变化ならびに糖鎖による疾患特異的な機能解明を試みた。

(1) マウスの心臓組織切片からレーザーマイクロダイセクションにより組織片を切り出し、左室壁・心室中隔など領域に応じた糖鎖情報をレクチンマイクロアレイ法により取得した。取得した糖鎖情報は、週齢・性差・疾患動物モデルにおいて比較し、老化と心疾患との関連性について検討した。

(2) レクチンマイクロアレイ法により取得した糖鎖情報を基に、領域または加齢などに特徴的な変化を示した糖鎖を認識するレクチンを用いて、各心臓組織切片を染色した。また、細胞ならびに組織特異的な抗体を用いて切片を染色し、変化の生じる糖鎖の所在を検討した。

4. 研究成果

(1) 個体老化を明確にするための試料作製および解析方法の確立を目指し、解析に最適なマウス心臓組織切片の作製を行った。老化モデルの対象として、当施設で保有する老齢マウスおよび購入した若齢マウスの心臓を丁寧に剥離し、脂肪や血液由来細胞を極力含まず、心臓の構造を保った状態で臓器を取得することに注力した。さらに、臓器の固定期間ならびに薄切の向き・厚さ・切り出し位置などを詳細に検討し、目的領域の最適な糖鎖プロファイルの取得を目指した。その結果、老齢マウスの心臓は肥大するとともに、構造維持が難しく（軟化傾向にあ

り)、脂肪の除去や形状維持のために若齢マウスよりも心臓の剥離に時間を要した。糖鎖解析のための組織切片の作製においては、水平を保った状態で心尖部から心房を確認できるよう薄切し各領域（組織）を切り出すことで目的部位を明確にし、連続切片を用いることで回収量をコントロール可能とした。心臓の糖鎖解析には、過去に実施した腎臓の縦断面から想定していた切り出し領域よりも2倍量必要であり、他臓器の糖鎖プロファイル解析に用いた糖タンパク質の抽出時よりもシグナル強度が弱いことが明らかとなった。

(2) 糖鎖プロファイル解析のために2カ月齢の正常なメスマウスの心臓組織切片を用いて

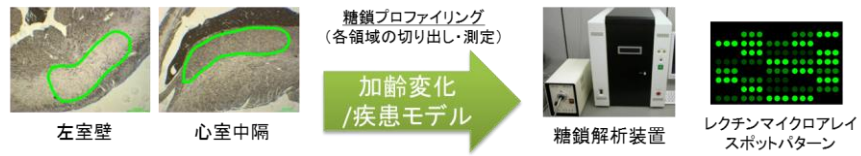


図1 各領域における心臓構成細胞の糖鎖変化

条件検討を行い、各領域の糖鎖情報を取得し蓄積した(図1)。経時的な糖鎖の変化を示すため、2カ月齢のマウスのほかに、成熟期、老齢期のマウスにおける糖鎖プロファイル解析を実施し、各世代における心臓の領域に応じた糖鎖情報を取得した。また、加齢に伴う変化を明確にするため、週齢の異なるマウスにおいて、糖鎖プロファイルデータを基に領域または加齢に特徴的な変化を示した糖鎖を認識するレクチンを用いて、各心臓組織切片を染色した。その結果、若齢および老齢マウスの糖鎖情報の比較において、レクチンから示唆された特定領域における毛細血管の顕著な減少が確認された(図2)。メスのマウスにおいて、加齢に伴い心重量は増加したが、体重の増加が著しく体重比は減少傾向にあった。

細血管の顕著な減少が確認された(図2)。メスのマウスにおいて、加齢に伴い心重量は増加したが、

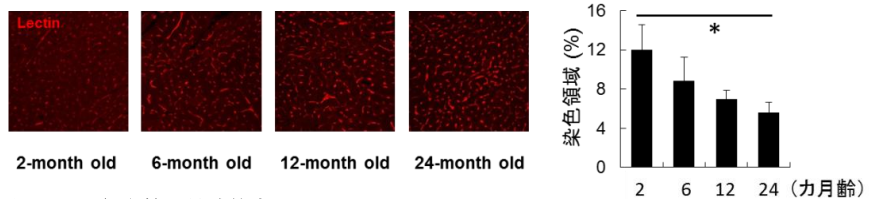


図2 毛細血管の経時的変化

したが、体重の増加が著しく体重比は減少傾向にあった。

(3) 正常なオスマウスならびに心筋梗塞モデルマウスにおける心臓組織切片の糖鎖プロファイル解析を行い、糖鎖情報を蓄積した。また、加齢に伴う変化を観察するため、メスと同様に週齢の異なるオスマウスにおいて、レクチンを用いた組織染色を行った。その結果、オスの心臓組織切片から抽出した糖タンパク質においては、糖鎖プロファイル全体における経時的な変化を示唆する情報が得られたが、その変化はごくわずかであり、明確な糖鎖構造は得られなかった。一方、心筋梗塞モデルマウスを用いた糖鎖プロファイル解析では、梗塞領域において正常マウスとは異なる複数の糖鎖における顕著な増加が確認された。

(4) 雌雄マウスにおける経時的な組織変化について、細胞の分子変化を検証した。雌雄ともに線維化関連マーカーを用いた組織染色による検討では、正常なマウスにおいて心臓の線維化が徐々に増加していたが、雌雄の間で加齢に伴う増加の仕方が異なることが明らかとなった。

また、心筋細胞の大きさは雌雄どちらも類似した特徴的な変化を示したが、その変化の時期がわずかに異なることを示した。細胞膜を染めたレクチンでは、老齢マウスの方が若齢マウスよりレクチンによる染色が不規則になり、細胞の輪郭が不鮮明になる傾向が見られた(図3)。これは、染色された糖鎖の構造または発現量が細胞膜上で減少していることを示唆している。

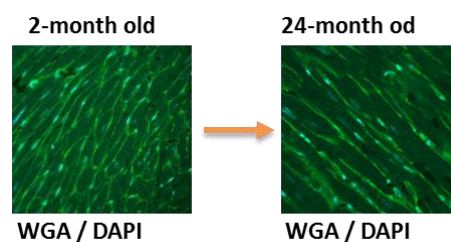


図1 細胞膜染色による細胞形態の比較

以上の結果から、正常なマウスの心臓において、加齢に伴い細胞上の分子に変化が生じている

ことが示された。そして、マウスの心臓において質的变化に性差が生じたように、ヒトの心疾患において性差が存在すること、その傾向は雌雄で類似する一方で変化の時期が異なることを示唆した。今後は、より詳細な分子変化を示し、ヒトの加齢と疾患発症のメカニズムの解明を目指す。

<引用文献>

- ① Itakura Y, Sasaki N, Kami D, et al., N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell Bioscience*, 6:14, 2016.
- ② Itakura Y, Sasaki N, Toyoda M. Qualitative and quantitative alterations in intracellular and membrane glycoproteins maintain the balance between cellular senescence and human aging. *Aging (Albany NY)*, 10(8):2190-2208, 2018.
- ③ Carrasco-Sanchez FJ, Paez-Rubio MI, Review of the Prognostic Value of Galectin-3 in Heart Failure Focusing on Clinical Utility of Repeated Testing. *Mol Diagn Ther*, 18(6):599-604, 2014.
- ④ Ho JE, Liu C, Lyass A, et al., Galectin-3, a Marker of Cardiac Fibrosis, Predicts Incident Heart Failure in the Community. *J Am Coll Cardiol*, 60(14):1249-56, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 7件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Itakura Y, Sasaki N, Toyoda M | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Qualitative and quantitative alterations in intracellular and membrane glycoproteins maintain the balance between cellular senescence and human aging. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Aging (Albany NY) | 6. 最初と最後の頁 2190-2208 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.101540 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 佐々木紀彦、板倉陽子、豊田雅士 | 4. 巻 90 |
| 2. 論文標題 老化関連疾患の予防、治療法の開発に向けた『老化と糖鎖』 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 生化学会誌 | 6. 最初と最後の頁 719-723 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900719 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Sasaki N, Itakura Y, Gomi F, Hirano K, Toyoda M, Ishiwata T. | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Comparison of functional glycans between cancer stem cells and normal stem cells. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Histol Histopathol | 6. 最初と最後の頁 995-1007 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-119. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M. | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Gangliosides Contribute to Vascular Insulin Resistance. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci. | 6. 最初と最後の頁 1819 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20081819. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 板倉 陽子 | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 老化に伴う糖鎖変化がもたらす細胞機能制御の解明に向けて | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 日本基礎老化学会誌 | 6. 最初と最後の頁 43-46 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Zou X, Yoshida M, Nagai-Okatani C, Iwaki J, Matsuda A, Tan B, Hagiwara K, Sato T, Itakura Y, Noro E, Kaji H, Toyoda M, Zhang Y, Narimatsu H, Kuno A | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 A standardized method for lectin microarray-based tissue glycome mapping | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 43560 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep43560 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Sialylation regulates myofibroblast differentiation of human skin fibroblasts. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cell Rese Ther, | 6. 最初と最後の頁 81 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-017-0534-1. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Itakura Y, Sasaki N, Kami D, Gojo S, Umezawa A, Toyoda M | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Cell Biosci | 6. 最初と最後の頁 14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13578-016-0079-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Itakura Y, Nakamura-Tsuruta S, Kominami J, Tateno H, Hirabayashi J | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: a comprehensive study | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 1160 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18061160. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Miura Y, Hashii N, Ohta Y, Itakura Y, Tsumoto H, Suzuki J, Takakura D, Abe Y, Arai Y, Toyoda M, Kawasaki N, Hirose N, Endo T | 4. 巻 1862 |
| 2. 論文標題 Characteristic glycopeptides associated with extreme human longevity identified through plasma glycoproteomics | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Gen Subj | 6. 最初と最後の頁 1462-1471 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2018.03.025. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

[学会発表] 計17件(うち招待講演 0件/うち国際学会 9件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Itakura Y, Kikkawa Y, Murakami Y, Kuno A, Nagai-Okatani C, Sasaki N, Toyoda M. |
| 2. 発表標題 Cardiac tissue glycome mapping using lectin microarray for heart failure cell therapy |
| 3. 学会等名 JAACT2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Itakura Y, Sasaki N, Toyoda M |
| 2. 発表標題 Comparative analysis of glycan alterations in intracellular and membrane glycoproteins with cellular senescence and human aging |
| 3. 学会等名 10th ACGG Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 板倉 陽子、吉川 友里香、村上 維菜、豊田 雅士 |
| 2. 発表標題 レクチンマイクロアレイ法を用いたマウス心臓組織のグリコームマッピング |
| 3. 学会等名 第7回日本比較病理学研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Itakura Y, Sasaki N, Toyoda M |
| 2. 発表標題 Comparison of membrane with cytoplasmic glycan profile changing with cellular senescence and human aging. |
| 3. 学会等名 24th International Symposium on Glycoconjugates (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Itakura Y, Nakamura-Tsuruta S, Kominami J, Tateno H, Hirabayashi J |
| 2. 発表標題 Novel features of sugar-binding properties of hevein family chitin-binding proteins. |
| 3. 学会等名 24th International Symposium on Glycoconjugates (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Itakura Y, Sasaki N, Toyoda M |
| 2. 発表標題 The cell surface and intracellular glycan profiling with the cellular senescence and the human aging. |
| 3. 学会等名 Keystone Symposia Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 板倉 陽子、佐々木 紀彦、豊田 雅士 |
| 2. 発表標題 細胞と個体がもたらす老化に伴う糖鎖の変化 |
| 3. 学会等名 第35回日本糖質学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 板倉 陽子、佐々木 紀彦、豊田 雅士 |
| 2. 発表標題 細胞老化および個体老化を示す細胞表層糖鎖の変化による老化指標の解析 |
| 3. 学会等名 第89回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Itakura Y, Sasaki N, Toyoda M. |
| 2. 発表標題 Alteration of glycans localization with cellular senescence and human aging |
| 3. 学会等名 International Glycoconjugate Organization (Glyco25) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 板倉 陽子、佐々木 紀彦、豊田 雅士 |
| 2. 発表標題 細胞および個体老化に伴う細胞の品質保持に関わる糖鎖変化の解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Norihiko Sasaki, Masashi Toyoda, Hisashi Yoshimura, Yoko Matsuda, Tomio Arai, Yoko Itakura, Fujiya Gomi, Junko Aida, Toshiyuki Ishiwata |
| 2. 発表標題 H19 long non-coding RNA contributes to the metastasis of pancreatic cancer cells by regulating cell adhesion |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Norihiko Sasaki, Masashi Toyoda, Hisashi Yoshimura, Yoko Matsuda, Tomio Arai, Yoko Itakura, Fujiya Gomi, Junko Aida, Toshiyuki Ishiwata. |
| 2. 発表標題 Metastasis-promoting role of H19 long non-coding RNA in pancreatic cancer cells |
| 3. 学会等名 The American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐々木 紀彦、板倉 陽子、豊田 雅士 |
| 2. 発表標題 ヒト冠状動脈内皮細胞の老化に対するラパマイシンの効果について |
| 3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kosugi M, Ootani M, Kikkawa Y, Itakura Y, Ito T, Toyoda M, Sekita Y, Kimura T |
| 2. 発表標題 Sex-chromosome-encoded histone demethylases, Kdm5c and Kdm5d, as the regulators of heart development |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sasaki N, Hasegawa F, Michishita M, Matsuda Y, Arai T, Ishikawa N, Itakura Y, Aida J, Takubo K, Toyoda M, Ishiwata T |
| 2. 発表標題 ABCG2-positive cells derived from ABCG2-negative pancreatic cancer cells in 3D-culture conditions show high stemness and anti-cancer drug resistance |
| 3. 学会等名 The American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sasaki N, Itakura Y, Masashi T |
| 2. 発表標題 Ganglioside contributes to insulin resistance in senescent and TNF α -stimulated human aortic endothelial cells |
| 3. 学会等名 International Vascular Biology Meeting 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐々木紀彦, 豊田雅士, 吉村久志, 松田陽子, 板倉陽子, 五味不二也, 相田順子, 新井富生, 石渡 俊行 |
| 2. 発表標題 鎖non-coding RNA, H19の膀胱癌における機能的役割について |
| 3. 学会等名 第4回がんゲノム・エピゲノム研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|-------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 豊田 雅士 (Toyoda Masashi) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 佐々木 紀彦 (Sasaki Norihiko) | | |
| 研究協力者 | 千葉 由美 (Chiba Yumi) | | |